

JULIANA GARCIA CARNEIRO

Mapeamento Genético da Mutação *Sacudidor de Cabeça* em Camundongos

**Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro de 2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA GARCIA CARNEIRO

Mapeamento Genético da Mutação *Sacudidor de Cabeça* em Camundongos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Brunialti Godard

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro de 2006

Sumário

Item	Página
Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Artigo 1	16
<i>Abstract</i>	17
<i>Introduction</i>	18
<i>Matherial and Methods</i>	19
<i>Results</i>	21
<i>Discussion</i>	25
<i>Acknowledgements</i>	27
<i>References</i>	27
<i>Anexo de Figuras</i>	29
Artigo 2	31
<i>Resumo</i>	31
<i>Introdução</i>	32
<i>Materiais e Métodos</i>	33
<i>Resultados</i>	38
<i>Discussão</i>	45
<i>Agradecimentos</i>	48
<i>Referências Bibliográficas</i>	48
Conclusão	51
Referências Bibliográficas	52

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de dedicar esta conquista a Deus, pela presença constante; aos meus pais e irmão, meus exemplos de vida, que sempre acreditaram no meu potencial e ficaram ao meu lado em todas as horas; à Ana Lúcia, que abriu as portas para mim e me orientou durante todo este período; aos meus amigos e familiares, pelo grande incentivo que sempre me deram; ao Bruno, Fabis, Marina, Lucas e Capolo, pela amizade verdadeira e presença nos momentos de alegria e de dificuldade; aos amigos do LGAH, pelo apoio incondicional que me deram. A todos vocês, muito obrigada.

Resumo

Os mecanismos responsáveis por patologias genéticas sempre despertaram o interesse da população humana. Com estes dados em mãos, é possível compreender melhor o desenvolvimento de determinada doença, suas formas de manifestação e desenvolver tratamentos cada vez mais eficazes, que venham a melhorar a qualidade de vida das pessoas. Distúrbios neurológicos são bastante comuns, o que torna interessante aumentar o número de estudos a respeito da função gênica por trás do que pode ser uma simples dor de cabeça até mesmo o Mal de Alzheimer. A geração de mutantes que recapitulam patologias humanas tem contribuído enormemente com estes estudos. A partir desses modelos é possível estudar o efeito de mutações em determinados genes e analisar as alterações causadas na expressão gênica. O camundongo é o organismo modelo mais utilizado, por sua grande similaridade com o genoma humano. Com base nestas informações, o presente projeto descreve o mapeamento genético de uma mutação neurológica denominada *Sacudidor de Cabeça* em camundongos. Ele foi dividido em quatro etapas; a primeira é uma introdução que aborda o histórico da genética de camundongos e apresenta as principais etapas envolvidas em um estudo de função gênica; o primeiro artigo, que descreve em detalhes o isolamento de mutantes com o uso de um agente mutagênico (ENU); o segundo artigo, que aborda o mapeamento genético da mutação *Sacudidor de Cabeça* e uma conclusão final sobre o projeto.

Abstract

The mechanisms responsible for genetic diseases were always of interest of human population. With these data it is possible to better understand the development of certain diseases and create treatments that improve human life quality. Neurological disturbance are very common, that is why it is interesting to increase our knowledgement about the gene function behind pathologies that can be just a simple headache or even Alzheimer Disease. Generation of mutants that resemble human diseases has been a huge contribution on these studies. From these models it is possible to study the effects of mutations in genes and it's subsequent alterations in gene expression. The mouse is the model organism of choice due to the great similarity between it's genome an the human one. Based on these informations, this project describes the genetic mapping of a mouse neurological mutation called *Sacudidor de Cabeça*. It was divided in four steps; the first one is an introduction about the history of mouse genetics, presenting the main steps evolved in a gene function study; the first article, detailing mutants isolation using a mutagenic agent (ENU); a second article, describing the genetic mapping of *Sacudidor de Cabeça* mouse mutation and a final conclusion about the hole project.

Introdução

É grande a incidência de doenças de origem genética na população humana. Milhares de pessoas sofrem com males que podem variar desde pequenos acometimentos até distúrbios severos, que muitas vezes vêm prejudicar a qualidade de vida. Por este motivo, o interesse em compreender os mecanismos genéticos por trás dessas doenças não é apenas da comunidade científica, mas também da população como um todo. O século XX representou um marco nos estudos de patologias hereditárias pela busca incessante de explicações para a origem de diversas doenças. Estas informações permitem conhecer as causas destes distúrbios e também o desenvolvimento de terapias eficazes, algo que tem sido, sem dúvida, o maior desafio dos pesquisadores. Os mecanismos genéticos responsáveis por vários males já são conhecidos, como é o caso das distrofias musculares, fenilcetonúria, diabetes, entre outras, e tudo indica que o número de informações tende a aumentar cada vez mais.

A maioria dos estudos de função gênica envolve o uso de organismos-modelo que recapitulam patologias humanas. Dentre os organismos utilizados estão leveduras, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, cães, gatos, ratos; no entanto, o camundongo é o organismo-modelo de maior escolha. É o segundo mamífero cuja genética é mais bem estudada, ficando atrás apenas dos seres humanos.

O uso de camundongos como organismos-modelo data de mais de um século. Já em 1905, Cuenót descreveu uma mutação de pelagem herdada de forma mendeliana (Paigen, 2003). Atualmente existem modelos animais para várias doenças humanas, dentre elas a Síndrome de Waardenburg, Síndrome de Usher, nanismo, obesidade (Moore, 1999), e já citadas anteriormente, fenilcetonúria e diabetes.

A publicação da seqüência completa do genoma do camundongo possibilitou um grande avanço nos estudos de função gênica (Waterston *et al*, 2002). Isso consolidou o camundongo como melhor modelo animal para distúrbios humanos, ao mostrar a grande similaridade entre os dois genomas. O genoma murino possui 2,5 gigabases distribuídas em seus 19 autossomos. É um pouco menor que o humano, porém compreende um número similar

de genes. São 30.000 até agora conhecidos, sendo que cerca de 99% destes, homólogos aos humanos. As regiões conservadas no genoma humano são encontradas espalhadas por todo o genoma do camundongo, e suas similaridades facilitam os estudos de identificação e localização de genes em ambas as espécies (Rew, 2003).

O camundongo também possui outras vantagens que o torna o melhor organismo-modelo para o estudo de patologias humanas. Estes animais possuem curto tempo de geração, são altamente prolíficos e se adaptam bem em condições de laboratório. O controle de sua genética também é simples. Existem atualmente várias linhagens isogênicas utilizadas em estudos de função gênica (Moore, 1999).

Uma linhagem é estabelecida através de um esquema de cruzamentos entre a progênie e seus parentais. É considerada isogênica após 20 gerações de cruzamentos sucessivos, quando 99,9% do genoma encontra-se em homozigose e é idêntico para todos os indivíduos da linhagem (Panthier *et al*, 2003). As linhagens também devem apresentar características que as diferem umas das outras e uma uniformidade fenotípica entre os indivíduos de uma mesma linhagem, o que permite afirmar que as variações experimentais são resultados apenas de fatores externos, sem comprometimento genotípico do animal. Por fim, a linhagem isogênica deve apresentar uma estabilidade genética ao longo do tempo, possibilitando que um experimento seja repetido entre animais de diferentes laboratórios (Benavides *et al*, 2004).

Atualmente existem cerca de 480 linhagens de camundongos, mantidas em laboratórios em todo o mundo (Benavides *et al*, 2004). A tabela 1 mostra as principais linhagens utilizadas e o número de laboratórios que as possuem.

Tabela 1
Linhagens de Camundongos mais utilizadas

Linhagem	Número de laboratórios
BALB/c	162
C3H	145
C57BL/6	116
CBA	113
DBA/2	92
C57BL/10	60
AKR	52
A/J	51
129	50
SJL	40

Fonte: Benavides *et al*, 2004

A escolha da linhagem utilizada em um experimento deve ser feita de maneira criteriosa. Deve-se verificar se ela consegue sobreviver às alterações fenotípicas a que será exposta. O animal deve ser capaz de expressar bem o caráter desejado. É importante também considerar as características intrínsecas da linhagem, para que elas não mimetizem ou mascarem o fenótipo introduzido (Montagutelli, 2000, Massironi *et al*, 2006).

O potencial dos camundongos como organismos modelo foi descoberto na metade do século XX. A partir desta época os estudos visando descobertas de novas mutações aumentaram, primeiramente, baseando-se em mutações espontâneas. No entanto, a frequência com que elas ocorrem em camundongos é muito baixa, na ordem de 1/20.000 a 1/100.000 por *locus*, por geração (Flaherty, 1998). Desta forma, depois de um determinado período sentiu-se a necessidade de produzir novas mutações de uma maneira mais acelerada.

Existem vários métodos de induzir mutações em camundongos, e cada um deles possui características e eficiências diferentes. A radiação ionizante, na forma de raios-X, raios- γ ou

nêutrons causam quebras no cromossomo, levando a grandes deleções, translocações, inversões ou outros rearranjos cromossômicos. Agentes químicos são bastante utilizados e são capazes de produzir mutações com grande eficiência. Este grupo compreende Clorambucil, Melphalan, Acrilamida, Ciclofosfamida, Etil-metanosulfato, Metil-metano-etil sulfato, Trietileno-melamina, Metil-nitrosourea e Etil-nitrosourea. Todos esses agentes causam alterações em algum momento da espermatogênese (Flaherty, 1998).

O etil-nitrosourea (ENU) é o agente mais utilizado em experimentos com camundongos e é considerado o mutagênico mais eficaz neste animal. Atua nas células espermatogoniais pré-meióticas, de forma que um grande número de animais mutantes pode ser obtido a partir de poucos camundongos tratados (Beckers *et al*, 2001). Sua taxa de mutações pode atingir 1.5 a 6.0×10^{-3} por *locus* (Guénet, 2004). ENU é um agente alquilante, capaz de induzir mutações pontuais aleatórias no genoma, diferente das radiações ionizantes e do Clorambucil, que causam grandes rearranjos cromossômicos. O seu grupamento etil pode ser transferido para qualquer nucleotídeo, causando um mau pareamento e uma substituição de bases que ocorre na fase seguinte da replicação do DNA. Isto ocorre porque, a partir de uma determinada concentração de ENU, há uma provável saturação do sistema de reparo do DNA, e a mutação fica, portanto, fixada no genoma do animal (Balling, 2001). Mais de 80% das mutações induzidas por ENU são formadas por transversões AT-TA ou as transições AT-GC (Balling, 2001).

A utilização de ENU nos animais deve seguir um protocolo rigoroso porque, além de mutagênico, ele é extremamente tóxico. As doses administradas devem ser bem calculadas, bem como o tempo de exposição ao mutágeno, para que seja estabelecido um balanço entre uma alta mutagenicidade e uma baixa toxicidade (Balling, 2001).

Quando administrados em grandes doses os agentes químicos podem causar esterilidade permanente. É de extrema importância que a dose e a frequência com que estes agentes são administrados seja bem controlada, de forma a potencializar sua capacidade mutagênica sem causar infertilidade no animal (Flaherty, 1998). Injeções de ENU em camundongos machos geralmente levam a uma diminuição no número de espermatogônias, o

que resulta em um período de esterilidade que dura cerca de 14 semanas (Balling, 2001). É importante ressaltar que nem todas as linhagens reagem igualmente ao tratamento por ENU, podendo ocorrer esterilidade permanente ou até mesmo morte dos animais (Balling, 2001).

O Jackson Laboratory possui, atualmente, uma das maiores coleções de linhagens mutantes que remetem a distúrbios humanos, e os camundongos vivos ou os embriões congelados estão disponíveis para toda a comunidade científica (Flaherty, 1998).

Nos estudos de função gênica são utilizadas diferentes estratégias para a obtenção dos animais mutantes. Cada uma possui suas vantagens e desvantagens, e a escolha de qual delas deverá ser aplicada é feita com base nos objetivos de cada experimento.

A primeira delas é denominada genótipo-dirigida, ou *reverse genetics*. Esta estratégia baseia-se na modificação de um gene já conhecido, com o intuito de analisar as variações fenotípicas resultantes dessas alterações, indicando, assim, a função deste gene em um determinado organismo. As modificações no gene podem ser conseguidas através de vários mecanismos. O primeiro deles é a utilização de animais *knock-out*, que apresentam parte de seu genoma deletado. Uma das técnicas usadas na obtenção de animais *knock-out* é a recombinação homóloga (Beckers *et al*, 2001). A recombinação homóloga produz a mutação desejada. Entretanto, é uma técnica extremamente trabalhosa (Prosser *et al*, 2003). Camundongos transgênicos também são bastante utilizados. Eles são gerados a partir da injeção de um vetor-alvo contendo uma seqüência de DNA exógena em um dos pró-núcleos de óvulos fertilizados. Os transgênicos permitem estudar os efeitos da super expressão de um determinado produto gênico no organismo do animal e, juntamente com a recombinação homóloga, são também utilizados para comparar a função de um determinado gene em diferentes espécies. Uma última maneira de manipular o genoma é pela tecnologia do *gene trapping*. Esta técnica abrange a integração genômica de um vetor que se liga a sítios aleatórios e utiliza a atividade transcricional do gene alvo para direcionar um cassete ou um gene repórter, causando uma mutação insercional (Beckers *et al*, 2001).

Contrariamente à estratégia genótipo-dirigida, a estratégia fenótipo-dirigida, ou *forward genetics*, se baseia na busca de uma mutação através da observação de um fenótipo já existente. Este fenótipo pode ser resultado de uma mutação espontânea ou, na maioria dos casos, gerada através da administração de agentes mutagênicos. Grande parte das mutações responsáveis por doenças genéticas humanas é causada por mutações de ponto. O ENU, por causar mutações pontuais no genoma, é considerado o agente químico ideal para essa estratégia (Balling, 2001; Birchmeier *et al*, 2001).

Existe um protocolo bem definido de cruzamentos que são utilizados na obtenção de animais mutantes por ENU. Estes cruzamentos podem ser de dois tipos: retrocruzamentos ou intercruzamentos. No retrocruzamento, os indivíduos da prole gerada são cruzados com um de seus parentais. É originada, dessa forma, uma geração N2. O intercruzamento é o cruzamento entre indivíduos pertencentes à mesma geração.

Para a obtenção de mutações dominantes, o camundongo macho tratado pelo agente químico é cruzado com uma fêmea da mesma linhagem. Estas mutações podem ser isoladas já na geração F1, onde 50% dos animais serão homozigotos normais e os outros 50%, mutantes heterozigotos.

Para a observação de mutações recessivas, a geração F1 é intercruzada, originando uma geração F2, que pode também ser intercruzada ou retrocruzada com seus parentais F1. Dessa forma, 25% dos indivíduos da geração F3 (ou N3, no caso do retrocruzamento) serão afetados.

A administração de ENU em camundongos machos leva a uma produção de espermatogônias cujo genoma haplóide carrega mais de uma mutação pontual. Os fenótipos mutantes observados na prole devem ser associados a apenas uma mutação. Desta forma, são feitos cruzamentos para gerar linhagens co-isogênicas. Isolada a mutação, é importante confirmar se o caráter observado é herdável. São feitos cruzamentos para verificar se o fenótipo é realmente transmitido entre as gerações, e em qual tipo de herança ele se encaixa (autossômica dominante ou recessiva, ligada ao sexo dominante ou recessiva) (Flaherty, 1998).

Confirmado o caráter hereditário, os mutantes devem passar por uma rigorosa análise fenotípica para que a mutação seja caracterizada corretamente. Esta análise é feita observando-se os animais desde o nascimento até a idade adulta. Os camundongos raramente são mantidos após seis meses de vida, o que dificulta a caracterização de distúrbios que aparecem numa fase mais avançada. Neste caso, mesmo que descobertas, não é muito viável o estudo genotípico, já que os animais possuem sua fertilidade reduzida nesse período (Flaherty, 1998). É necessária uma observação cautelosa, principalmente quando se deseja identificar mutações neurológicas. Alguns fenótipos são mais óbvios que outros. No entanto, algumas características são extremamente difíceis de serem identificadas, como as que causam distúrbios metabólicos, de aprendizagem ou memória, ou aquelas mutações que levam a uma morte intra-uterina ou logo após o nascimento (Flaherty, 1998).

Deve-se também verificar se a mutação isolada é nova ou se já foi descrita. Isso pode ser feito consultando-se bancos de dados, como Mouse Genome Database (MGD – www.informatics.jax.org), pertencente ao Jackson Laboratory. Esses bancos de dados possuem informações a respeito do fenótipo de mutantes já isolados, permitindo uma comparação com o mutante de interesse (Flaherty, 1998).

Concluída a caracterização fenotípica, o próximo passo envolve localizar a mutação no genoma, verificando se a mesma está presente em um *locus* próximo a genes já conhecidos e que expressam um fenótipo semelhante (Flaherty, 1998).

O mapeamento genético é a construção de mapas através do uso de marcadores herdados. É também chamado de mapeamento de recombinação ou análise de ligação (Boyd, 1998). O mapeamento permite delimitar a região cromossômica onde se encontra a mutação estudada. Através dele também é possível descobrir se se trata de uma segunda mutação em um gene já conhecido ou se ela encontra-se em um novo *locus*. Portanto, a localização da mutação no genoma pode possibilitar a seleção de regiões candidatas, que serão posteriormente analisadas por seqüenciamento e estudos de expressão gênica, para confirmá-las como responsáveis pela disfunção (Beier *et al*, 2004).

O mapeamento genético é feito a partir da análise de ligação entre um marcador e o *locus* de interesse. Esta análise é feita com base no padrão de segregação entre os *loci* através das gerações. Durante a meiose, ocorrem os eventos de recombinação (ou *crossing over*) entre os gametas. As Leis de Mendel afirmam que dois *loci* não-ligados possuem segregação independente. Dessa forma, a probabilidade de uma geração, em um cruzamento-teste, herdar o haplótipo parental é sempre 50%. É observada ligação quando essa probabilidade se desvia de 50%, devido a um excesso de haplótipos parentais. Isso ocorre porque os *loci* estão ligados, ou seja, estão muito próximos um do outro, tornando raros eventos de recombinação entre eles (Boyd, 1998).

Os microssatélites são os marcadores mais utilizados em estudos de mapeamento genético. São repetições em tandem de pequenas seqüências de DNA, e encontram-se espalhados por todo o genoma de quase todos os organismos existentes. Esses elementos de repetição possuem aproximadamente 2 a 8 nucleotídeos (Chambers *et al*, 2000). Os microssatélites encontram-se amplamente distribuídos no genoma do camundongo e isso facilita o mapeamento de *loci* localizados em qualquer região cromossômica.

Quando se pretende mapear uma mutação em camundongos, o primeiro passo é realizar cruzamentos entre os animais mutantes e animais normais pertencentes a uma linhagem diferente, produzindo dessa forma, indivíduos híbridos. Estes indivíduos podem ser inter cruzados ou retrocruzados com seus parentais, produzindo uma nova geração de mutantes que possuem padrões genotípicos distintos uns dos outros. O número de repetições de cada microssatélite varia entre as espécies e entre as linhagens de camundongos. Esse polimorfismo é muito importante em estudos de mapeamento, pois, através dele, é possível observar o padrão de segregação do marcador com o *locus* de interesse. Quanto mais próximo um marcador estiver do *locus*, mais rara a ocorrência de recombinação entre eles.

A unidade de medida utilizada em um mapa genético é o centimorgan (cM). 1 cM corresponde a 1% de recombinação (Boyd, 1998). Um mapeamento é considerado de alta resolução quando são observados eventos de recombinação entre o marcador e o *locus* distantes em 0,1 cM. Para que seja possível observar estes eventos muitas vezes torna-se

necessário testar um grande número de animais, para que a probabilidade de um deles apresentar esse haplótipo aumente.

Delimitada a região cromossômica que abriga o *locus* mutante, o próximo passo é a procura por genes candidatos presentes nela. Essa busca pode ser feita com base em bancos de dados disponíveis na Internet, como o Ensembl Genome Browse (www.ensembl.org) e o Mouse Genome Informatics – MGI (www.informatics.jax.org). Estes programas apresentam informações sobre o genoma completo do camundongo, como a localização de todos os genes e marcadores conhecidos. As informações sobre a função de determinado gene, aliados ao mapeamento genético e a análise fenotípica dos animais permite classificá-lo ou excluí-lo como candidato à mutação. O sequenciamento e os estudos de expressão gênica vêm para confirmar a hipótese do gene candidato e concluir, portanto, o estudo da função gênica.

O presente estudo abrangeu a identificação, caracterização e mapeamento genético da mutação *Sacudidor de Cabeça*. Esta mutação possui caráter autossômico dominante e foi gerada a partir da indução de ENU em camundongos do Biotério de Experimentação Animal da Universidade de São Paulo. A dissertação foi dividida em dois artigos; o primeiro descreve o projeto de geração de novas mutações a partir da indução de ENU em camundongos, a partir do qual foi isolada a mutação *Sacudidor de Cabeça*, entre outras. Nele são citados todos os protocolos utilizados no manejo dos animais e a forma de tratamento administrada para cada mutante. Também discute as vantagens do uso do ENU na indução de novas mutações. Este artigo já foi submetido ao *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.

O segundo artigo é referente ao mapeamento genético da mutação *Sacudidor de Cabeça*. Nele se encontram todas as características fenotípicas do animal, os resultados dos testes histológicos e comportamentais realizados, o resultado do mapeamento genético e os possíveis genes candidatos à mutação. O artigo também discute a importância deste mutante como um provável modelo animal para algum distúrbio neurológico humano.

Artigo 1

Assessing gene function by inducing mutations in the mouse genome

SMG Massironi¹, BLFS Reis³, JG Carneiro³, LBS Barbosa³, CB Ariza⁴, GC Santos³, JL Guénet², ALB Godard³

¹Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo;

²Unité de Génétique des Mammifères, Institut Pasteur, Paris, ³Laboratório de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; ⁴Departamento de Bioquímica, Disciplina de Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo

Short running title – Inducing mutations in the mouse genome

Key words- mutation, Ethyl-nitrosourea, mouse

Corresponding author- Silvia Maria Gomes Massironi. Av. Professor Lineu Prestes, 1730. Biotério de Experimentação, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo Brasil. CEP 05508-900. Phone – 55 11 30917398 FAX- 55 11 30917224. e-mail-smgmass@usp.br.

Acknowledgement- Support for this work was provided by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo)

Abstract

Systematic production of mutant phenotypes in mice can be achieved basically through two approaches: gene-driven and phenotype-driven. Through the gene-driven approach, also known as the transgenic production, it is possible to explore the function of already known genes. The induction of mutants through the phenotype-driven approach enables the identification of new genes and their relevant biological pathways. The most efficient chemical drug used to induce mouse mutations is Ethyl-nitrosourea (ENU), an alkylating agent which generates point mutations in mouse DNA. Consistent with its mode of action, ENU can induce both loss and gain of function. Using ENU as a mutagenic drug in mice, several laboratories throughout the world have created grand scale programs with the aim of increasing the number of mutations available, generally associated with protocols of systematic phenotypic analysis. These studies have yield immunological and behavioral models, not yet known. On the other hand, modest programs can equally contribute to this effort, once the mutant induction occurs by chance. In our laboratory, a modest project of ENU mutagenesis produced eleven new mutant alleles from which five have been localized on the mouse genetic map as a first step towards positional cloning. To map these mutants and study their phenotypes a group of Brazilian laboratories joined efforts to better explore these new models.

Introduction

The publication of the complete sequence of the genome of human and some other model organisms (rat, mouse) can be considered a landmark achievement in life sciences. Analysis of these sequences with specialized software utilities has revealed a great deal of new information concerning the genome structure, opening the way to a new discipline: comparative genomics. However, the analysis of the individual sequences, if it can help in the identification of genes and other important genomic sequences, does not reveal much concerning their function(s) and this is why, as of today, functional information is available for no more than 30% of the mammalian genes. The greatest challenge for the next phase of genomic research will certainly be to identify functional DNA from the rest of the sequence and to assign a role to it; and the only reliable way to reach this goal is to specifically address this question through experimentation.

Experiments performed with this aim are based on two strategies:

-The first, termed "reverse genetics", consists in the production of targeted alterations in the genome, which result in either the non-expression or the misexpression of an unknown gene. Such mutations are in general engineered *in vitro*, and once they have been induced, mutant genotypes are bred and their phenotype thoroughly carefully scrutinized in the context of the whole organism. This strategy, due to its nature, is often referred to, as a "top-down" approach. With the availability of embryonic stem cells (ES cells) this strategy has become very popular in many laboratories and several hundreds of transgenic mice have been generated world wide . More recently, trans-national projects have even been approved by funding agencies for the concerted and systematic production of at least one null (knockout) mutations in each and every gene of the mouse genome. There is no doubt that such projects, when completed, will dramatically implement our knowledge of the function of genes.

- The second strategy for gene annotation is based on the observation of phenotypic variations in a given population followed by the molecular identification of the underlying genetic factor(s) after positional cloning. Since it proceeds from phenotype to genotype, this strategy is a "bottom-up" approach and is often called "forward genetics" .

Both strategies have been widely used in model organisms, in particular in the mouse, and both have advantages and drawbacks. The production of targeted mutations is a

straightforward approach for the annotation of genes with virtually no limitation. One can consider, for example, that any DNA sequence whose function is unknown can be altered *in vitro* and a mouse embryo can be produced with the mutation in the homozygous state to study its phenotypic effect. With some refined techniques this engineered can even be made conditional and/or tissue specific. However, the production of targeted alterations in the genome requires experience and rather sophisticated skills and equipments. More importantly, in many instances, it ends up with inconclusive phenotypes. This is the case for example when the targeted gene appears to be essential and its inactivation leads to early embryonic death or, conversely, when the inactivated gene leads to a very subtle or difficult to assess phenotype or even no phenotype at all. Positional cloning of mutations whose phenotype is obvious is sometimes a tedious enterprise that requires the breeding of hundreds of mice to reduce to a minimal size the interval harboring the mutant *locus*, but it is always informative and requires only simple molecular techniques. In fact, one can consider that both strategies are complementary rather than alternative with, however, the peculiarity that, while *in vitro* genetic engineering is universally applicable, positional cloning requires that mutations with a clear cut phenotype be available.

In this paper we report the conclusions of an experiment we undertook five years ago, with the aim of producing new mouse mutations with the potent chemical mutagen Ehtyl-Nitroso-Urea (ENU). We found eleven new mutant alleles out of which five have been localized on the mouse genetic map as a first step towards positional cloning.

Material and Methods

Animals

BALB/c, C57BL/6 and NZB mice were obtained from the Breeding Mouse Facility of the Department of Immunology of the Institute of Biomedical Sciences (ICB), University of São Paulo. During the treatment and breeding period, mice were kept in micro-isolators in rooms, with sanitary barriers. The temperature was maintained constant with range $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ and with 12 hours light and dark intervals. The mice received commercial food (Nuvilab - Nuvital ®)

and water *ad libitum*. The work was approved by the ICB USP ethical committee in 2000 with the number 29/2000.

ENU treatment

BALB/c strain was chosen for mutagenesis protocol because this strain tolerate ENU treatment and as an isogenic strain has its chromosomes well known. On the other hand, using a white strain it is not possible to detect fur coloration mutants. ENU (SIGMA Ref N3385-ISOPAC N8509) was dissolved in a pH 5 solution, of which male mice, 8 to 10 weeks old, received a single intra-peritoneal dose of 250 or 200 mg/Kg or multiple injections of 100 or 95 mg/Kg at weekly intervals for three to four weeks. The treated mice were held for a week in complete isolation until they had cleared the carcinogenic substance. Waste refuse and bedding was destroyed by highly concentrated chlorine solution.

Breeding scheme

ENU treatment induced a sterile period up to seven months. After recovering fertility, BALB/c males treated with mutagen were mated to BALB/c females, and the offspring were observed so that dominant mutations arising in germ cells of the treated males could be detected in F1 progeny. To recognize recessive mutations, male of F1 generation were mated with normal BALB/c females and mated again with their female offspring. In doing so, most of the induced recessive mutations remained in a homozygous state becoming observable in the G3 generation (Figure. 1). For those pedigrees in which recessive mutations were identified and tagged, and new crosses were established to keep the new mutation in a BALB/c coisogenic status.

Identification of mutant phenotypes

The identification of mutant phenotypes was made by careful examination of the behavior and integrity of the offspring of the mutagenised males from birth onwards. Body size, ears, eyes, skin, hair, behavior, skeleton, tail and extremities, were routinely examined for visible defects.

Mapping process

Male homozygous or heterozygous for a new mutation were mated with females partner of C57BL/6 or NZB strains. These strains were chosen because they have good fecundity and show relatively high genetic divergence from BALB/c mice. Intercross or backcross progeny were bred and mutant phenotypes identified (Figure 2). Using PCR technology (1), DNA sample prepared from the new mutants were then analyzed by PCR technology and to a genome-wide scan with 54 molecular markers (microsatellites) was undertaken to determine which of the markers constantly co-segregate with the mutant phenotype. In a first step, 50 mutant mice were used in the linkage analysis, for the positional cloning, 500 mutant mice were needed to construct a high resolution genetic map of the region.

Result analysis

The DNA used for mapping was analyzed for linkage disequilibrium. Linkage, once established, was further investigated using new markers to reduce the critical interval containing the mutant *locus*. Phenotypical characterization of each mutation was achieved while mapping was in progress, including histopathology, morphology and behavior.

Results

ENU treatment

Four schemes of ENU treatment were used to determine the best dose to use for BALB/c males, in our experimental conditions. All treatments lead to a sterile period lasting between 21 and 30 weeks. The mortality and infertility rates tended to diminish with the fractioning of doses, even considering the rate of 40 % obtained in the treatment of 3 X 95 mg/Kg.

Table 1– Mortality, fertility, sterile period and number of pedigree established after treatment of BALB/c males with different doses of ENU

ENU dose (mg/Kg)	No. of males	Mortality %	Sterile period (weeks)	Fertility %	pedigree established	Mutants obtained
250	35	42.9	30	28.6	49	mergulhador, rodador, Sacudidor de Cabeça
200	34	26.5	22	5.9	16	careca
3x100	30	13.3	30	40.0	70	equilibrio, nervoso, cruza pernas, sem pêlo, bate palmas
3 x 95	10	40.0	21	50.0	72	anêmico, fraqueza

Mutants obtained

Eleven mutations were obtained that could be fixed as BALB/c co-isogenic strains. Table 2 describes the phenotypes observed and, for some of these, the chromosomal location. Only one dominant mutation (Sacudidor de cabeça) was fixed, while all other were recessive. Several mutations were lost mainly due to infertility. The majority of lost mutations were dominant.

The carefully observation of ENU treated males lead to identification of different phenotypes affecting skin, equilibrium, development and behavior. Their names, given in Portuguese, describe the main characteristic of each mutant. According to fertility and availability of parameters to distinguish mutants and non-mutants it was possible to establish breeding schemes for mapping some of the genes.

Table 2- Mutants obtained and chromosomal location

Mutation	Inheritance	Main phenotype	Chromosomal location	Symbol
anêmico	Recessive	Anemia	Not established yet	<i>anem</i>
bate palmas	Recessive	Clapping when carried by tail	Not established yet	<i>bapa</i>
careca	Recessive	Fur development	Chr. 7	<i>carc</i>
cruza as pernas	Recessive	Crossing limbs when carried by the tail	Not established yet	<i>crup</i>
equilíbrio	Recessive	Tilted head	Chr. 17	<i>eqlb</i>
fraqueza	Recessive	Progressive loss of movement coordination	Chr.1	<i>frqz</i>
mergulhador	Recessive	Tilted head	Chr. 5	<i>mlh</i>
nervoso	Recessive	Anxiety behavior	Not established yet	<i>nerv</i>
rodador	Recessive	Circling behavior	Chr. 10	<i>roda</i>
Sacudidor de Cabeça	Dominant	Head tossing movement	Chr. 15	<i>Sacc</i>
sem pêlo	Recessive	Fur development	Chr. 11	<i>nude^{sepe}</i>

The first mutation mapped was *mergulhador* (*mlh*). This recessive mutation affects the ability of the mouse to swim. Under normal laboratory conditions, *mergulhador* mice exhibit head-tilting but show no other behavioral abnormalities such as circling or head-tossing. The gene, located on chromosome 5, was recognized as an allele of the mutation *tilted* that affects balance by impairing otoconial morphogenesis without causing collateral deafness. *Tilted* and *mergulhador* are then two mutant alleles at the gene *Otopetrin 1* (*Otop1*) *locus*. The gene encodes a multi-transmembrane domain protein that is expressed in the macula of the developing otocyst. Both mutants carry single point mutations leading to non-conservative amino acid substitutions that affect two putative transmembrane (TM) domains (*tlt*, Ala151!Glu in TM3; *mlh*, Leu408!Gln in TM8). *Otop1* and *Otop1*-like paralogues, *Otop2* and *Otop3*, define a new gene family of genes with homology to the *C. elegans* and *D. melanogaster* DUF270 genes (2).

Careca (*carc*) is a recessive mutation that shows hair abnormalities from the first pelage. Hairs are sparse; especially around the eyes, on the limbs and belly. Between 45 to 60 days, some mice lose all of the fur; then hairs reappear, always scattered. Histological analysis of adult skin showed an increase of skin thickness due to a great number of follicles in anagen, which is the active growth phase when the hair fiber is produced. At the same age hair follicles of controls BALB/c were in telogen, known as a rest stage. *Careca* has been localized on chromosome 7.

Sacudidor de Cabeça (*Sacc*) is a dominant mutation that makes the mice to shake their head continuously. The intensity of movement varies according to the agitation. When manipulated, head-shaking intensifies. This movement stops only when the mice are asleep. This mutation was located on chromosome 15.

The recessive mutation *rodador* (*roda*) makes the mice continuously walk in circles while moving their head up and down. There again, agitation varies according to the agitation state, when manipulated mice shake head more intensively. *Rodador* mutant has been located on chromosome 10.

Another recessive mutation obtained was called *equilíbrio* (*eqlb*), due to its problems manifested in motor coordination. These mice always keep their head tilted downward and the permanence on rota-rod is diminished when compared to controls. This phenotype, that clearly

shows problems in balance, suggests that the cerebellum development is impaired. The equilibrium mutant has been located on chromosome 17.

The mutant *sem pelo* (*nude^{sepe}*) presents no hair throughout their lifespan, the thymus is absent, and complementary crosses confirmed that it is a new allele of the *nude* mutation.

The mutant *fraqueza* (*frqz*) has been recently located on chromosome 1; this is a recessive and lethal mutation. Mice progressively lose movement coordination and die at four to six weeks of age. The lifespan can be extended a bit, by enriching the cage environment and making water and food available into the cage, once the mice can no longer stand to take them. *Anemico* (*anem*) is a recessive mutant that presents yellowish color at birth, easily observed among BALB/c neonates. Adults show ears and tail extremely white, fertility is reduced in males and females. Preliminary phenotype characterization showed reduction in red blood cells number and increase in reticulocytes and leukocytes number.

The mutants *bate palmas* (*bapa*) and *cruza pernas* (*crup*) show abnormal movement of posterior legs when carried by tail. These movements suggest problems in balance and motor coordination. The phenotype characterization and mapping will begin as soon as the breeding performance of both mutations improves.

The behavior of *nervoso* (*nerv*) mutant refers anxiety. The movements in the cage are sometimes quicker than normal, when carried by the tail mice shake vigorously all the body. It was observed spontaneous seizure in some mice. Better characterization of phenotype is needed to permit the selection of mutants for mapping.

Discussion

ENU is a powerful mutagen agent that enables the generation of countless point mutations in different parts of the mouse genome (3). The point mutations allow gradual alterations in the gene and detailed studies involving its function. ENU allows the identification of genes previously unknown, since the random mutations different from gene targeting does not depend of the previous knowledge of the localization and the sequence of the genes. It is important to emphasize that the alleatory mutagenesis differs from the transgenesis being compulsorily punctual, while the transgenesis production always change a significative portion of the sequence. With ENU it is possible to obtain several alleles of the same *locus*

which will interfere in different ways in the phenotype, while using knock-out technology it is generally possible to create just one null allele.

ENU efficiency depends upon the dose and scheme of treatment. In our work, single and fractionated doses were assayed; our results show that the fractionated doses seem to diminish infertility and augment to a degree the number of mutants obtained. With fractionated doses of 100 mg/Kg Hitotsumachi and colleagues (4) obtained a higher mutant index.

The phenotypic examination of the animals in F1 and F2 generations after ENU treatment involves different protocols in order to maximize the recognition of mutations and to isolate mutations of subtle phenotypic effect. Some phenotypes are easy to identify as problems in the coloration, visual structure of the fur and bone malformations (5). The neurological and behavior problems demand advanced examination that requires special methods (6). More sophisticated methods of phenotype diagnosis, as magnetic resonance, are being developed to complement and to speed up the characterization of the mutants (7). In this project the mutants were firstly identified by carefully observation of the phenotype; the pedigrees in which some abnormalities where identified were continuously observed. Some basic tests were employed to confirm some of the mutations, even without a sophisticated method of phenotype diagnosis; it was possible to identify valuables mutations. Using more sophisticated methods it would certainly be possible to find mutations with late onset or lethality at birth.

The correct characterization of phenotype is a crucial step for all the process that aims the discovery of the responsible gene for the mutation. The correct handling of the animals is essential for the success of ENU treatment and the characterization of the mutation. The phenotype expression in mice, as well as in human beings, is highly susceptible to changes in the environment. One must pay attention to the way the tests are applied. A simple change in the order of the experiments can influence the results of the tests, depending on the stress that the mice are submitted (7). Another important point is the choice of the strains used in the generation of hybrids for mapping. Mutants that express a particular behavior in one background cannot present the same behavior when background is mixed (7). Furthermore, it is important to certify that the phenotype observed results only from the generated mutation or is related with the background in which it was inserted (8). In our work the first attempt for mapping the nervoso mutant was unsuccessful; the behavior of this mutant could not be distinguishing in the hybrids obtained for mapping. The recognition of this mutation in

BALB/c background is quite easy; because the affected mice are very different from the normal ones that are not agitated; on the other hand in the BALB/c X C57BL/6 F2 generation it was very difficult to find a reliable parameter to distinguishing them. New parameters must be tested to permit the mapping of this mutant.

The projects of induction ENU mutants certainly increase the collection of sequenced point mutations in mouse genoma, leading to the discovery of new genes or improving the studies of function with allelic variants added. The information that will be extracted from the functional studies and genetic of the mutants, combined with data from other projects and manipulated by modern computational tools, certainly will favor the understanding of the routes in which the genes are involved and of its biological functions. Our program, although modest in scope, has led to the discovery of several mutations that may contribute to fill the phenotype gap in the mouse mutant resource. The ratio new mutant/new allele seems to be the same found in literature, it means 40% (9). Even modest ENU programs may contribute to this goal, since the mutations occurs by chance and the results could collectively be joined to achieve the main objective to create a mutant map of the mouse whereby every gene is related to some information regarding its function.

Acknowledgements- The authors are grateful to Joelma dos Santos Lima for the special care with the mice.

References

1. Rhodes M, Straw R, Fernando S, Evans E, Lacey T, Dearlove A, Greystrom J, Walker J, Watson P, Weston P, Kelly M, Taylor D, Gibson K, Mundy C, Bougarde F, Poirier C, Simon D, Brunialti A, Montagutelli X, Guénet J-L, Háynes A, Brown SDM (1998). A high resolution microsatellite map of the mouse genome. *Genome Research*, 8: 531-542.
2. Hurler B, Ignatova E., Massironi SM, Mashimo T, Rios X, Thalmann I, Thalmann R , Ornitz D.(2003). Otoconial agenesis in tilted and mergulhador mice caused by mutations in *otopetrin1*. *Human and Molecular Genetics*, 12:777-789.

3. Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, Phipps EL (1979). Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proceedings of the National Academic Science USA*, 76: 5818–5819.
4. Hitotsumachi S, Carpenter DA, Russell WL (1985). Dose-repetition increases the mutagenic effectiveness of N-ethyl-N-nitrosourea in mouse spermatogonia. *Proceedings of the National Academic Science USA*, 82:6619-6621.
5. Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, Zheng B, Bradley.A (1999). Mouse ENU mutagenesis. *Human and Molecular Genetics*, 8:1955-1963
6. Brown SD & Balling R (2001). Systematic approaches to mouse mutagenesis. *Current Opinion in Genetics and Development*, 11:268-273.
- 7 Keays DA & Nolan PM (2003). N-ethyl-N-nitrosourea mouse mutants in the dissection of behavioural and psychiatric disorders. *European Journal of Pharmacology*, 480: 205-217.
8. Montagutelli X (2000). Effect of the Genetic Background on the Phenotype of Mouse Mutations. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11: S101–S105.
9. Guénet J-L (2004). Chemical mutagenesis of the mouse: an overview. *Genetica*, 122:9-24.

Anexo de Figuras

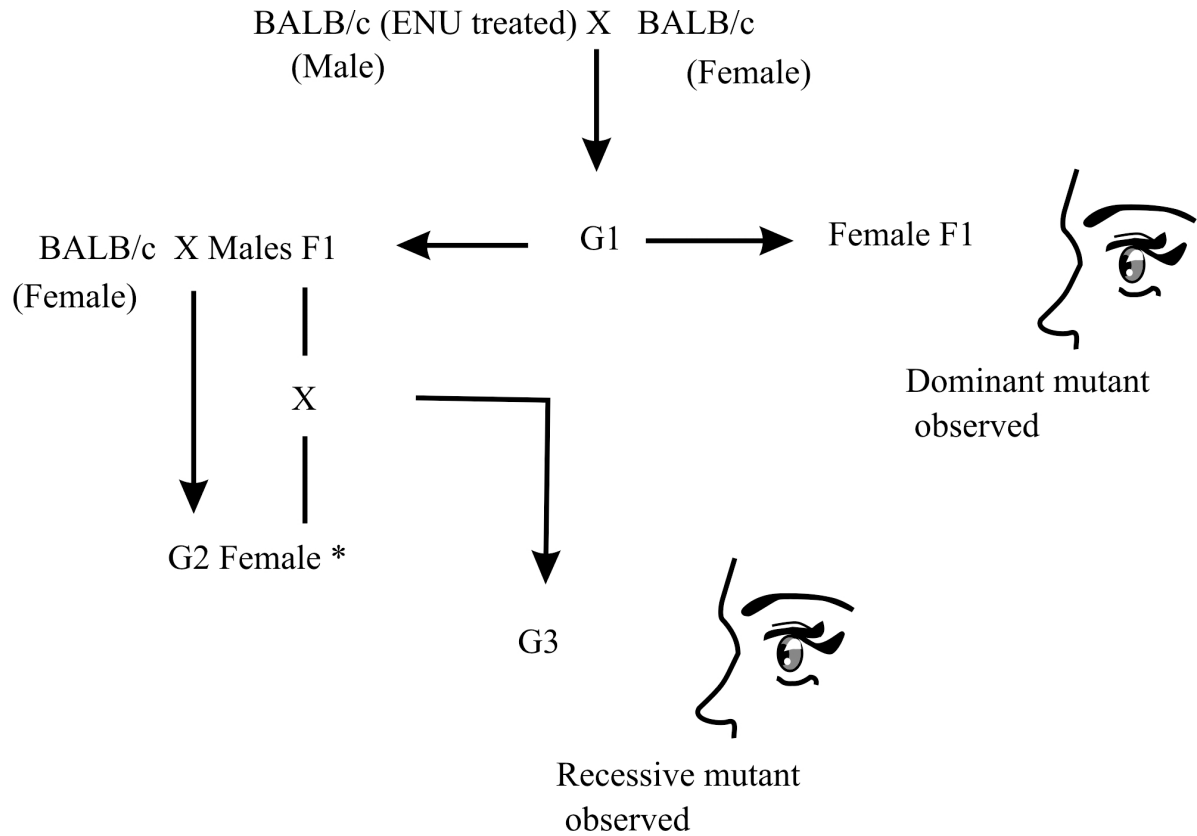


Figure 1 – Breeding schemes in the mutagenesis screens for dominant and recessive mutations. BALB/c (ENU-treated) males are mated with BALB/c females. Their progeny (G1) are observed for dominant mutant phenotype. G1 males are mated to wild-type BALB/c females to generate G2 families. Matings of G2 females with their G1 fathers give rise to G3 progeny that can be observed for recessive phenotype.

* 4 G2 females are mated with their fathers.

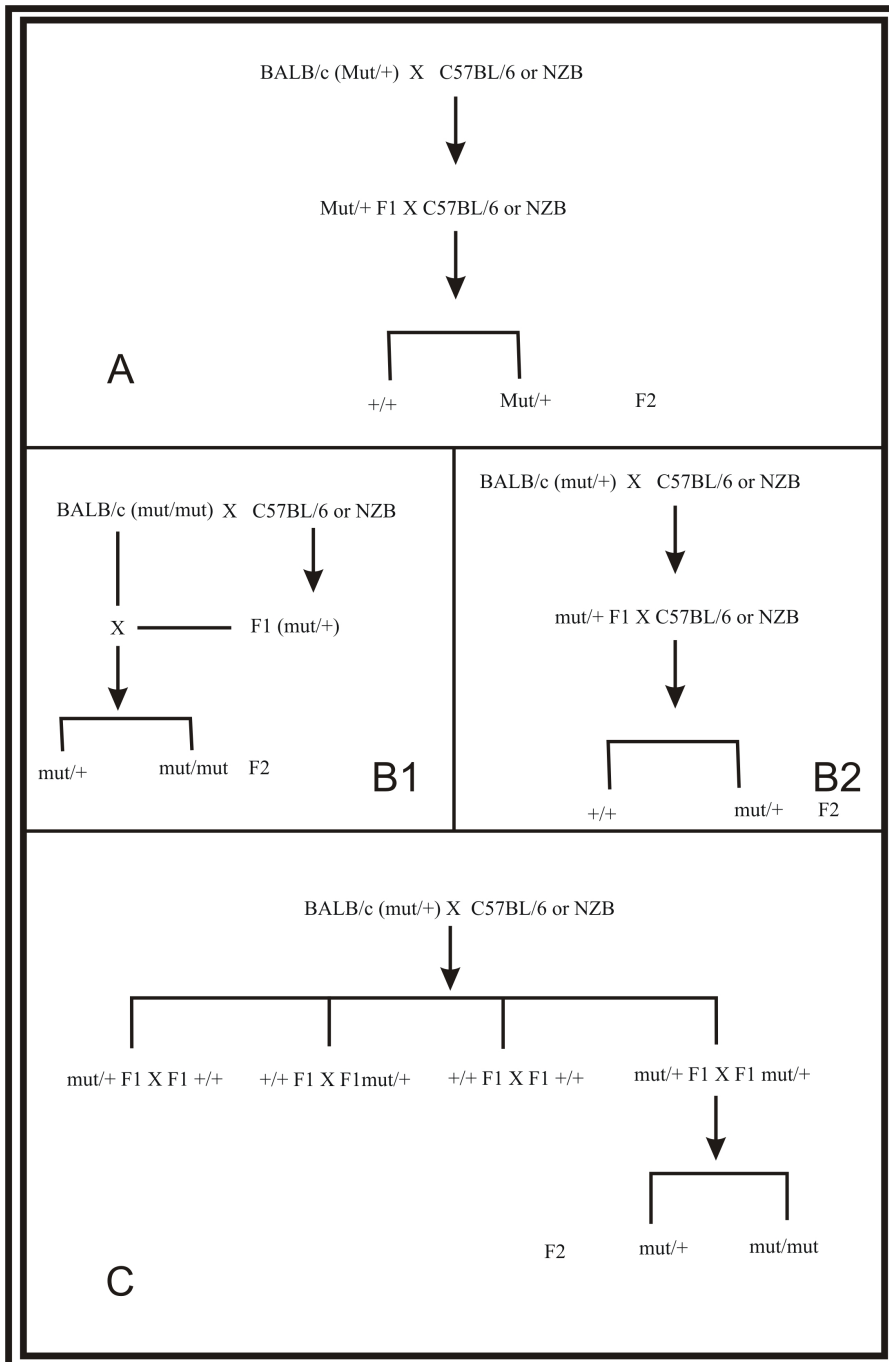


Figure 2 – Breeding schemes in mutagenesis mapping. (A) for dominant mutations, (B1) backcross and (B2) intercross for viable and fertile recessive mutations (C) for non viable and infertile mutations. DNA of F2 mutants are analyzed.

Artigo 2

The New Neurological Mutation *Sacudidor de Cabeça* Maps at Mouse Chromosome 15

Carneiro, J.G¹; Massironi, S.M.G²; Porcionatto, M⁵.; Rzadzinska, A³; Steel, K.P³.; Guenét, J-L⁴; Godard, A.L.B^{1*}

¹Laboratório de Genética Animal e Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

²Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

³Sanger Institut, UK

⁴Unité de Génétique des Mammifères, Institut Pasteur, Paris

⁵Escola Paulista de Medicina, São Paulo

*brunialt@icb.ufmg.br

Resumo

Disfunções nervosas acometem grande parte da população humana. Clinicamente podem se manifestar de múltiplas formas, desde discretos sinais, às vezes quase imperceptíveis, até distúrbios complexos capazes de levar a lesões incapacitantes e óbito. Essa gama de apresentações clínicas dificulta o diagnóstico, especialmente considerando a complexidade anatômica e funcional do sistema nervoso central. Desta forma, torna-se extremamente importante estudos mais aprofundados dos mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento e nas doenças do SNC. O uso de camundongos como modelos animais tem sido amplamente utilizado, e já provou ser uma estratégia eficaz no estudo dessas patologias. Muitas dessas doenças são de caráter degenerativo e têm como expressão clínica movimentos involuntários de determinadas regiões do corpo comandadas por músculos esqueléticos. A mutação *Sacudidor de Cabeça*, em camundongos, é caracterizada por tremores constantes de cabeça e pescoço nos animais mutantes, provavelmente resultado de uma degeneração nos núcleos da base. Esta mutação foi induzida através da administração de ENU em camundongos. O mapeamento genético, juntamente com as análises histológicas e

comportamentais, permitiu selecionar genes que atuam sobre o sistema nervoso, e, por isso, potenciais candidatos à mutação.

Introdução

O sistema nervoso é responsável pela maioria das funções orgânicas, recebendo milhões de informações a partir dos diferentes órgãos sensoriais e integrando-as para determinar a resposta a ser dada pelo corpo (Guyton *et al*, 1998). Todos os dias milhões de pessoas normais sofrem com os vários sintomas das doenças nervosas, que compreendem, entre outras, cefaléias, dores lombares, tontura, euforia, dormência, contrações musculares involuntárias, espasmos, câimbras, tremores e paralisias (Cecil, 2005).

Também é grande na população humana a incidência de distúrbios neurológicos graves, como o Mal de Parkinson, Doença de Huntington e Alzheimer, tornando importante o desenvolvimento de pesquisas que procuram elucidar os mecanismos de função gênica envolvidas nestas doenças. Os avanços no campo da genética estão mudando rapidamente a classificação das doenças neurológicas e explicando seus mecanismos. Estas mudanças não têm acontecido somente na área neurológica, mas o impacto destes estudos tem sido significativamente maior no sistema nervoso do que em outros sistemas, talvez pelo fato de haver um grande número de genes expressos nesse sistema e da complexidade dos mecanismos responsáveis pelo seu desenvolvimento (Cecil, 2005).

Os núcleos da base representam um sistema motor acessório que funciona em associação com o córtex cerebral e o sistema motor corticoespinal. Possuem o papel de controlar os padrões complexos de atividade motora, como os movimentos hábeis e, juntamente com o cerebelo e o córtex, são também responsáveis pelos movimentos involuntários do organismo. Os núcleos da base são constituídos pelo núcleo caudado, putâmen, globo pálido, substância negra e núcleo subtalâmico (Guyton *et al*, 1998).

Uma disfunção nos núcleos da base pode comprometer tanto os movimentos voluntários quanto os involuntários. Uma distonia é uma disfunção de caráter contínuo. Nesta condição as contrações involuntárias também ocorrem durante o repouso. Aumenta com o estresse, fadiga, atividades, e desaparece durante o sono (Cecil, 2005).

Já existem modelos animais, principalmente camundongos, para muitas doenças neurológicas humanas, tais como a doença de Huntington. Estes modelos estão possibilitando a descoberta da história natural da doença e podem abrir fronteiras para novos tratamentos (Cecil, 2005).

A mutação *Sacudidor de Cabeça* foi induzida no Biotério de Experimentação Animal da Universidade de São Paulo, como parte de um projeto envolvendo a indução de novas mutações (Massironi *et al*, 2006). Camundongos da linhagem BALB/c receberam um tratamento com o agente alquilante etil-nitrosourea (ENU), e os mutantes foram isolados na primeira geração, caracterizando uma mutação autossômica dominante. Os mutantes se desenvolvem normalmente, são férteis, possuem um tempo de sobrevivência normal. No entanto, a partir do oitavo dia de vida, os animais apresentam tremores de cabeça e pescoço. Estes movimentos ocorrem constantemente, sua intensidade aumenta em situações de estresse, e desaparecem durante o sono.

Este projeto envolveu o mapeamento genético a média resolução da mutação *Sacudidor de Cabeça* de uma região na porção telomérica do cromossomo 15 e a seleção de genes presentes nesta região cujos produtos são expressos no sistema nervoso.

O objetivo deste projeto foi mapear a mutação *Sacudidor de Cabeça* em camundongos, e selecionar genes candidatos presentes na região. Foi estabelecida uma região cromossômica no cromossomo 15 que apresenta homologia com os cromossomos 8q, 12q e 22q humanos. Cinco genes foram selecionados e considerados candidatos potenciais à mutação.

Materiais e Métodos

Geração dos Animais Mutantes

Camundongos pertencentes às linhagens *BALB/c* e *C57BL/6J* foram obtidos no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Camundongos *BALB/c* machos, entre oito a dez semanas de vida, receberam uma dose intra-peritoneal, única, de 250 mg/Kg de ENU (SIGMA Ref N3385-ISOPAC N8509), dissolvido em uma solução pH 5,0.

Após o período de esterilidade (aproximadamente trinta semanas) os animais tratados foram cruzados com fêmeas não-tratadas da mesma linhagem. A progênie foi observada em busca de mutações dominantes.

A manutenção e os cuidados com os camundongos neste estudo estavam de acordo com as normas de utilização do National Institut of Healt (NIH). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do ICB/USP em 2000, sob o número 29/2000.

Mapeamento Genético

Camundongos machos *Sacc/+^{BALB/c}* foram cruzados com fêmeas normais da linhagem *C57BL6/J*, e a prole foi retrocruzada com seu parental normal, gerando os cento e sessenta mutantes híbridos utilizados no mapeamento.

O DNA foi extraído do baço e rim e o protocolo padrão utilizado envolveu o uso de Proteinase K (20mg/ml) e tampão de lise (Tris HCl 50mM pH 8.0; EDTA 10mM pH 8.0 e 0,5% SDS) (Miller *et al*, 1998). O DNA foi lavado em etanol 70% e diluído em solução de TE. A concentração de DNA extraído foi quantificada por espectrofotometria de massa sob comprimento de onda de 260/280nm.

Um total de sessenta e seis marcadores microssatélites, que cobrem todo o genoma murino, foi selecionado com base em bancos de dados disponíveis on line (www.informatics.jax.org; www.ensembl.org) (tabela 1). Os fragmentos foram amplificados por PCR (94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, por 35 ciclos) e resolvidos em gel de Acrilamida 12,5%.

Tabela 1 - Marcadores Utilizados no Mapeamento Inicial

Marcador	Cromossomo	Seqüência Foward (5' - 3')	Seqüência Reverse (5' - 3')	Tm (°C)
D1Mit14	1	GCCAGACAGGGCTACATTGT	AGACTGAACTCTGGCCTCCA	50
D1Mit211	1	GTTATTCATCAAATACAGATGGCC	TCTGCTGCTAAGTAGAATGAATGC	55
D1Mit529	1	AAAAAAAAACCTGACATCAGATGTG	GTTTTTCTCTAGAAAACAACAAACACA	50
D2Mit244	2	AGGGCTCTGCTCATGCAC	ACCACCTGTATCATGGACTTCA	55
D2Mit269	2	CGTGTTTAAGGTGGTGTGA	TTGGAAAACAATGTTTGATTCA	58
D2Mit274	2	AGGCATTGTCAAGACCAACC	TACGTTTCTCAACTCATCAGTGTG	55
D3Mit22	3	AAGGATTGAAGAATGGTTGGG	AATCAGCGATTTTCAGCACG	55
D3Mit44	3	CCTGACTCATTTATTTAACTCCCC	CCCTATCACATAGGGCAACC	55
D4Mit58	4	TATTTTTTGGGTTTGAAGGG	CCTTGCAGCCCACTCAGT	55
D4Mit189	4	CACTACACGGGGCTGAGATT	AAGATCCAACACCCTTTTTGG	55
D4Mit214	4	CCCTACAAGTTGTCTCTGACC	CACCAGTGTGAGAGCAGGA	52
D5Mit24	5	CACTTGCCACACAGCAGG	CGTGCATGCACTAGTGTGTG	52
D5Mit148	5	GCTGCAAAGAAGAGAGAGGG	CCTCTGGCCAGCATGATATA	55

D5Mit149	5	TCAGGAAGTGATCTTCCAACG	ATCTGATGCCTCTGACCTTCA	55
D5Mit233	5	TCCCCTCTGATCTCCTCAGA	CCTCCTAGAATACAATTCAATGTGG	55
D6Mit129	6	TGTCTCAGAAGACCCAGGCT	CAGAGAATATGTAAGTTGTTATGAGGG	55
D6Mit223	6	ACATTGGTAGTAGACTTGATATTTCCA	TTACATGCTTGAGTGCTGGC	55
D6Mit294	6	TGGTACAGGGCACTGTCATC	CTTATGGCTACTGGGACCCA	55
D7mit38	7	GTGTATGATGGAATGTGGAGACA	ACAGCCCCAGGAAAGCATT	58
D7Mit259	7	CCCCTCCTCTGACCTCTT	GTCTCCATGGGAACCACACT	55
D7Mit270	7	CCCTCCATCATCCTCCTTC	TCTCAAAAAGTCAATGGTGCC	55
D8Mit64	8	CTAGAACCATGTGTGCGCAT	TGCATGATCTATAGAAACCCT	55
D8Mit166	8	AGAAGGGAAAAACTAACTCCCG	ATTGGAGATGGTGCATGTAGG	55
D8Mit364	8	CTCTGAGCCCTCCCCCTC	ATCTGTCACTGAGTCTGTTTCTCTG	55
D8Mit102	8	AATAATTGAGCATGGGTGGG	AGGCTGCATAAACTGAACCA	55
D9Mit18	9	TCACTGTAGCCAGAGCAGT	CCTGTTGTCAACACTGATG	55
D9Mit247	9	TTTTAATGGAGAGGGTGAGGG	AAGGAGACCCTGGGTGAGAG	58
D10Mit170	10	ACTGACACTCCAGACATAAACACA	CATTTTGCACATTAGACTACACCC	55
D10Mit282	10	ACATGCTGTTTCTATTGAATGCC	CAGTGACCACCACTATAAACAGC	55
D10Mit283	10	CACACACACATGCTTGC	GAAGTGA CTGCTCCCTGCTC	55
D11Mit168	11	CAGGGATTTGACTTTTAACTCC	GAAATGGCTCCTACAACCTCC	55
D11Mit215	11	GCCAGTGTAGAAATTAAGCCAT	ATGGCTTCTCAGGAAAGAATGAAG	55
D11Mit231	11	TCTTTAAAATGTTTATGATCTGTGGC	GGCCTTGGATGTGCATAGAT	55
D11Mit320	11	CCCATATAGTGAAGCAAGAAACG	TATAGTGTATGCATCCAGGTGTG	55
D12Mit5	12	CACATAGACCAGACAGGCATGCGT	CAAGGTCACGTTGCTAGCTAGGAA	55
D12Mit19	12	GCTTCTTTTTTCTAGAGACCATGA	GGAGGTAGAAGGCTGTACATGG	55
D12Mit184	12	CCTGTGTGCACACCCCTC	TTGTTTTATTGTAATTTATTAGCGCG	55
D13Mit233	13	TAAATTTTCCCTCTGTCTCTTTTTT	AAAATGCTGGAGCAAGAAATG	55
D13Mit262	13	CTGCGGCTGTAGGTTAAGTATG	AGGCTGCTGCTAACAGATGG	55
D13Mit221	13	GGACTGGATTGTCTTGTGTGTTG	ACACCAATCAATCAAATCATTCA	55
D14Mit37	14	GTCGATGGATGACTGCTGC	CATGGGGACTCAGGAGATTG	55
D14Mit133	14	TTGTCAAATAATTGCATGAGGC	AACTATGACTCAGATTCCAAGTTGG	55
D14Mit266	14	ATGCACAGGATTGATCTGCA	AGCATGACCTAATAATGAGACCC	55
D14mit228	14	TTGTTAATTGCTGTACCATACACA	ACGTA CTCACTGATTGTAATGTG	55
D15Mit100	15	CAAGACCGAGCCAAAAACTC	ACCTCAGATTACTGATGTGGGG	55
D15Mit156	15	CCCACATTCATGCACATATAGG	AACAAATCAAGAACCAATTGGG	55
D15mit270	15	ATGAGGCTCAATAAGATAAGATGTG	GTTGCTACTGTAATGTCTCCTGTG	55
D15Mit242	15	GGTATACACACACACAATTTCAAGG	GAAAATAGTACCACAGAAGTTGGG	58
D16Mit5	16	CGGGGATCATCCCTAAAAAC	TCCCAATTCTCTTGTGTC	55
D16Mit56	16	ATATTAATAATGGTTCTCAAGAGGA	CTTCATCTAAGTATGTGAAGGTCTGC	55
D16Mit154	16	AAATCAATCCCAGAGAAACAGG	TCTTGTGTGTGTGTGCATGC	55
D17Mit152	17	CCAGTATTCTAGCTGCCCGA	GATAAAAATGAGATCAAGATGGGG	55
D17Mit221	17	AACCAGATCATTAACAGTAATAAAGCA	TTGTGGCAAAAACAACCAAA	55
D17Mit228	17	CGTTTGCCTGACAGTGTCC	GAATGTTCCAGAGACTGCTGC	55
D18Mit51	18	AACATGGTGGAAACCAACTACC	AAGGGAAAGTCACCACATGC	55
D18Mit172	18	TGGGGTCTATCCTTCTGC	AGTGATACTTACTTTATCACACATGCG	55
D18Mit49	18	TTACTCACTTTTCCACTTGCTAGG	CTGCACACACCACTTGCC	55
D19Mit1	19	AATCCTTGTTCACTCTATCAAGGC	CATGAAGAGTCCAGTAGAAACCTC	55
D19Mit36	19	ATAAGACTTGAGGTTGACCTCTGG	CTGTAACAATGGGAACTGTAGGG	55
D19Mit68	19	CCAATACAAATCAGACTCAATAGTCG	AGGGTCTCCCCATCTTCTA	55

Análises Histológicas

Ouvido Interno:

Para auxiliar a caracterização fenotípica, foram realizadas análises histológicas do ouvido interno e cerebelo dos animais mutantes. Foram utilizados animais *BALB/c* controle P20 e animais adultos (acima de P30). Foram testados animais *Sacudidor* de diferentes idades, P13, P20 e acima de P30. Os órgãos foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Microscopia de Luminescência (LM).

Preparação das Amostras para SEM

As amostras das bulas auditivas dos animais mutantes e controle foram coletadas, fixadas com glutaraldeído 2,5% e imersas em tampão Cacodilato de Sódio 1mM. Foram realizadas análises no Órgão de Corti. As voltas apical, média e basal foram comparadas entre os animais mutantes e controle.

Preparação das Amostras para LM

As amostras foram fixadas com Paraformaldeído 4% e imersas em tampão PBS 1X. Foram realizadas análises dos ossículos pertencentes ao sistema vestibular.

Cerebelo

Foi realizada a histologia do cerebelo de dois animais afetados por cortes sagitais e as lâminas foram coradas pela técnica de Cresil-Violeta.

Testes Comportamentais

Um total de onze animais foi utilizado nos testes comportamentais: um animal controle e dez animais mutantes, com idade entre 20 e 30 dias. O protocolo utilizado nos testes encontra-se listado a seguir.

Reflexo Auditivo

É realizado um teste simples para testar a capacidade auditiva dos animais. Com o auxílio de uma pinça é feito um barulho próximo às caixas onde estão os animais mutantes e

controle. Os animais com capacidade auditiva normal apresentam um reflexo nas orelhas quando expostos a algum barulho.

Resposta de Alcance

O camundongo é segurado pela cauda e aproximado da superfície. Observa-se se o animal estica suas patas dianteiras em direção ao chão, que é a resposta normal (nota 1), ou se ele as recolhe em direção ao abdômen (nota 0).

Geotaxia Negativa

Os animais são colocados em uma rampa inclinada a 45°, direcionados para baixo. Se o animal descer a rampa, é dada uma nota 0. Por outro lado, se ele subir a rampa, recebe nota 1, já que é o comportamento normal.

Plataforma Elevada

Os camundongos são colocados em uma plataforma de metal, com 7 cm de largura, a 45cm do solo. É colocada serragem no solo, para evitar que os animais se machuquem caso caiam. Se o animal permanecer na plataforma por 2 minutos, é dada uma nota 2; se ele escorregar, mas conseguir se segurar por até 2 minutos, é dada nota 1; no entanto, se ele cair, é dada a nota 0. Animais normais não apresentam dificuldades em se equilibrar na plataforma.

Teste de Natação

Este teste mede o vigor do animal dentro da água. O camundongo é colocado em um recipiente com água a uma temperatura de aproximadamente 25°C. Camundongos geralmente são bons nadadores. O animal é observado durante 1 minuto e recebe uma nota de acordo com seu estilo e vigor no nado (nota 0 para mau nadador e 3 para bom nadador). O animal que apresenta dificuldades é retirado da água e recebe nota 0.

Resultados

Mapeamento Genético

Cruzamentos entre camundongos machos *Sacc/+^{BALB/C}* e fêmeas normais *C57BL6/J* geraram mutantes híbridos, que, retrocruzados com seu parental normal, deram origem à geração N3 composta, no total, por cento e sessenta animais mutantes utilizados no mapeamento.

A análise inicial foi feita com a genotipagem de dez animais *Sacc/+*, com os sessenta e seis marcadores selecionados. Esta análise apontou uma forte ligação do *locus Sacc* com o marcador D15Mit242, localizado a 90,7 Mb do cromossomo 15, pois todos os dez animais foram heterozigotos para este marcador. Doze novos microssatélites compreendidos nesta região foram selecionados e testados com os cento e sessenta animais mutantes (Tabela 2). Os marcadores D15Mit242 e D15Mit77 delimitaram uma região de 9,2 Mb (Figura 1), que apresenta homologia com os cromossomos 8q, 12q e 22q humanos. A análise do conteúdo genômico desta região permitiu identificar 93 genes de função conhecida. Através da observação fenotípica e análises histológicas, foi feita uma avaliação de quais seriam os possíveis genes candidatos à mutação. Foram selecionados 5 genes; alguns deles possuem associação já descrita com distúrbios humanos. Estes genes encontram-se listados na Tabela 3.

Tabela 2 - Marcadores Utilizados no Mapeamento a Média Resolução

Marcador	Cromossomo	Seqüência Foward (5' - 3')	Seqüência Reverse (5' - 3')	Tm (°C)
D15Mit35	15	ATGCATTTTTAAAATTTAGT	CCCATAACTCTTGATAGTCAAA	55
D15Mit147	15	GATGTGTGAAAAATTTGTTTCTTG	GTCTCAAAGGAATAAGAAAGAGATGG	55
D15Mit192	15	TCCAAATGCAGGAAAGATCC	TGAATTTATGGAATATTTGATGTGTG	55
D15Mit217	15	TTGTGCTTTTATCTGGCATTGC	GACACATAACGTCTTTACTCTTCTCC	55
D15Mit39	15	CATCAAGGGGATAGAGAGTTGG	TGGGAATTGAGCCTGAGTCT	55
D15Mit14	15	GAGAGGAAAACCATGTCAATCACT	TCCTCTTAAACCAAGATCTCTGCT	55
D15Mit281	15	GTCATGGAATAAGGATGGAAGC	AGGATGTATGCGATTCTGGG	50
D15Mit76	15	ACAACACTGCCTTCTTTGCC	GACAGGCATTTTTGGACACA	52
D15Mit193	15	TTGTGTAAGCCAATCTAATAAAGCC	GTTGCTGTGCTCATGGTGTC	52
D15Mit246	15	GAACATCATCCCCATCCTTAACA	ACCAACTCTGGAGATGTCTTCTG	52
D15Mit191	15	CAGTTCCATCTTGCTCTGCA	TTGTTAGTATGATAGTAACCCTCCCC	52
D15Mit77	15	CTTGGGCTATAGGGAGGACC	GCCGTGCATTTGTAATAATG	55

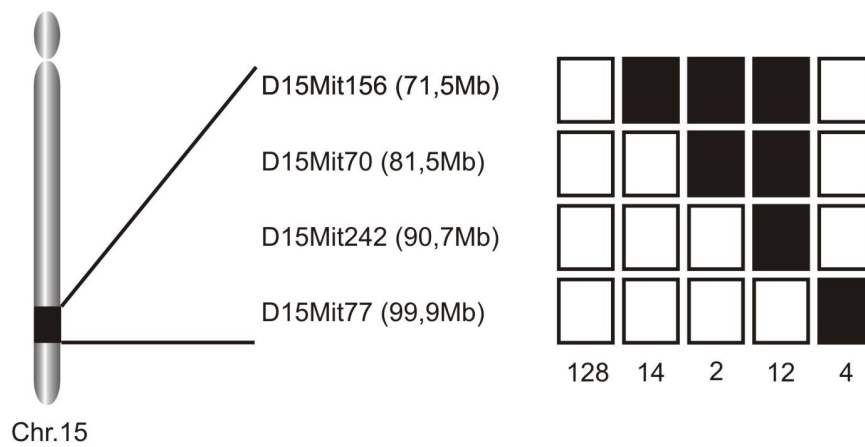


Figura 1: Haplótipo representando os 160 animais testados. Os quadrados coloridos indicam a presença do alelo C57BL6/J. Os quadrados claros indicam a presença dos alelos BALB/c e C57BL6/J. Os números abaixo de cada coluna indicam o número de animais que apresentam o mesmo padrão genotípico. A região onde se encontra o *locus* mutante foi delimitada entre os marcadores D15Mit242 e D15Mit77, na porção distal do cromossomo. A região mapeada é homóloga aos cromossomos 8, 12, e 22 humanos.

Tabela 3
Possíveis Genes Candidatos

Nome	MGI Symbol ID	Localização cromossômica (Mb)	Locais de Expressão
Kinesin Family Member 21A	Kif21a	90,98 Mb	Cérebro. Em neurônios, encontrada nos axônios e dendritos
Leucine-rich repeat kinase 2	Lrrk2	91,72 Mb	cérebro, substantia nigra
Solute Carrier Family 38	Slc38a	96,64 Mb	Células-tronco neurais
Calcium-channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	Cacnb3	98,69Mb	cérebro
Rho Family GTPase I	Rnd1	98,72 Mb	Cérebro (córtex cerebral e hipocampo)

Source: www.ensembl.org; www.uniprot.org

Testes Comportamentais

Os mutantes *Sacudidor de Cabeça* responderam positivamente ao estímulo auditivo, indicando que não apresentam quadro de surdez. Os animais controle e mutantes esticaram as patas quando segurados pela cauda (nota 1). Todos os animais mutantes, juntamente com o controle, subiram a rampa inclinada quando colocados sobre ela (nota 1). Na plataforma elevada, o animal controle se equilibrou por pelo menos dois minutos. Cinco mutantes apresentaram o mesmo comportamento (nota 2), e cinco escorregaram mas conseguiram se segurar por um minuto (nota 1). No teste de natação, o animal controle e oito mutantes receberam nota máxima (nota 3), enquanto que dois apresentaram certa dificuldade e receberam nota 2.

Análises Histológicas

Cerebelo

A análise histológica mostrou um padrão normal do cerebelo (Figura 2a;b;c;d). As células de Purkinje e as células granulosas encontram-se presentes e com sua morfologia semelhante à dos animais não mutantes.

Ouvido Interno

Análise do Sistema Vestibular por LM

Os ossículos dos animais mutantes possuem o mesmo aspecto dos animais controle (Figura 3). Todas as partes do sistema vestibular estão presentes: sáculo, utrículo, ampolas lateral, anterior e posterior. As otocônias estão presentes na superfície macular do sáculo e utrículo. Observou-se a falta da eminentia cruciata na ampola lateral dos animais mutantes. Porém, esse mesmo aspecto foi encontrado nos animais controle. As células ciliares estão presentes, com os estereocílios em tamanhos graduados. O tamanho dos estereocílios varia de acordo com sua localização, característica também observada nos animais controle.

Análise por SEM

Foi observada, nos animais mutantes, uma fileira adicional de *outer hair cells* na volta apical da cóclea. Nos animais controle, foram observadas apenas 3 fileiras (Figura 4a;b;c;d). Observou-se também, nos mutantes, degenerações de estereocílios ou falta de alguns estereocílios ao longo da cóclea em animais acima de 20 dias de vida, período em que os tremores já são observados (iniciam-se a partir do oitavo dia de vida do animal). Os estereocílios nas IHC e OHC estavam presentes e arranjados normalmente.

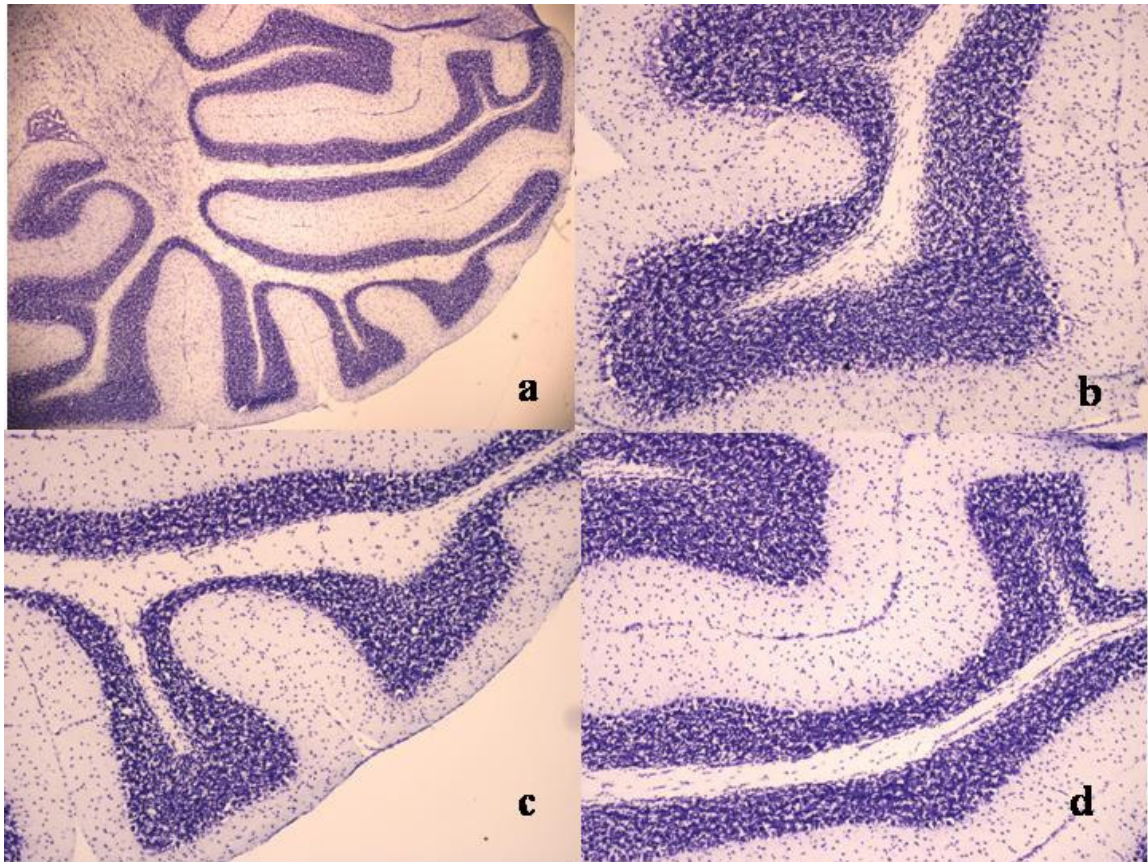


Figura 2: Cortes sagitais de algumas camadas do cerebelo. Lâminas coradas por Cresil-Violeta. 2a: aumento de 4x, mostrando toda a região analisada; 2b: folha 9, em um amento de 10x; 2c: folhas 7 e 8, também no aumento de 10x; 2d: folhas 3, 4 e 5 do cerebelo, aumento de 10x. Observa-se um aspecto normal das células granulosas (coradas em violeta) e das células de Purkinje, que limitam as células granulosas.

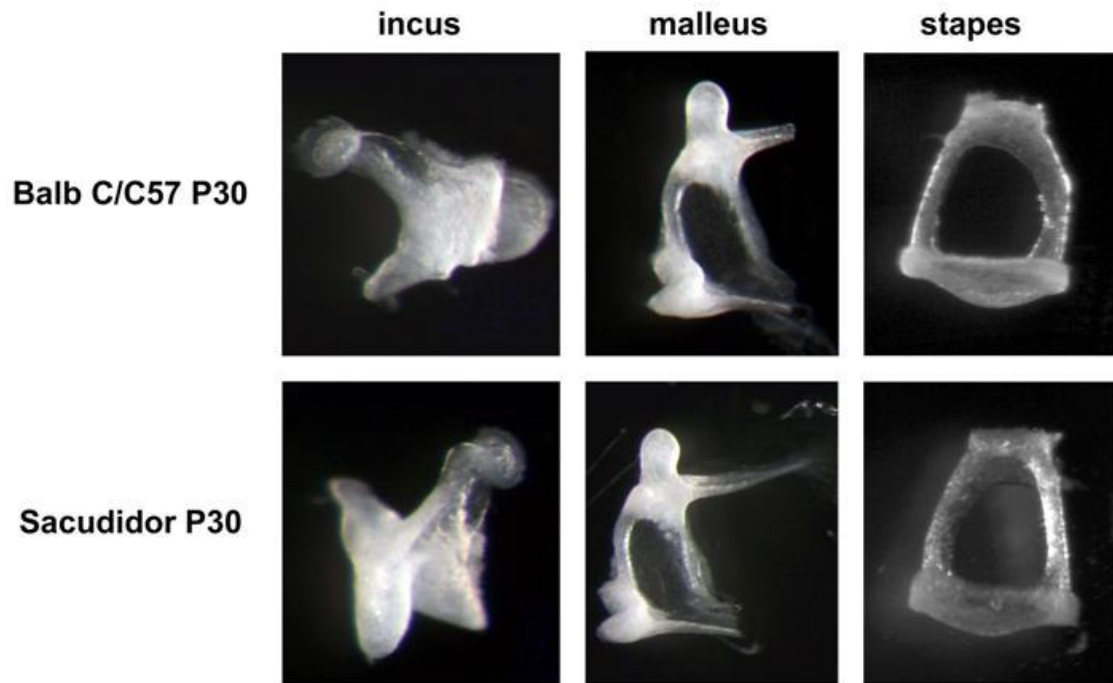


Figura 3: ossículos do ouvido (estribo, martelo e bigorna). A morfologia destes nos animais mutantes (Sacudidor P30) é semelhante à observada nos animais controle (BALB/c/C57 P30).

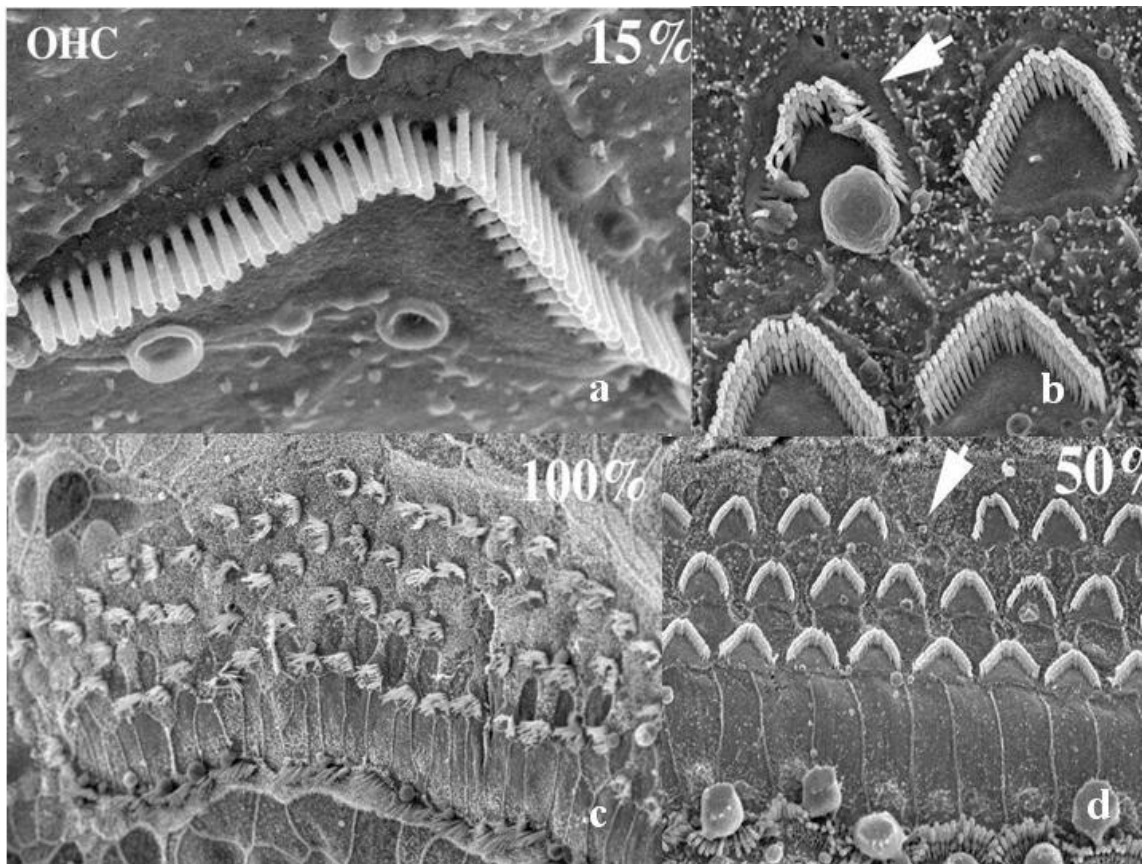


Figura 4: SEM do ouvido interno dos animais mutantes e controle. 4a: morfologia das OHC na volta basal da cóclea de camundongos controle; 4b: organização das estereocílios em animais *Sacudidor* P30. A seta indica desorganização de uma fileira na volta mediana da cóclea; 4c: fileiras de estereocílios na porção apical da cóclea de animais mutantes P30. Esta figura ilustra a presença de uma fileira adicional de OHC. Os animais controle possuem apenas 3 fileiras; 4d: volta mediana da cóclea de um *Sacudidor* P30, onde são observadas ausências de alguns grupamentos de estereocílios (mostrado pela seta).

Discussão

O mapeamento genético possibilitou delimitar uma região de 9,2 Mb na porção telomérica do cromossomo 15. O estudo detalhado do fenótipo do mutante torna possível que o distúrbio tenha natureza neurosensorial. A região estabelecida é rica em genes, porém foram selecionados apenas aqueles que apresentam expressão no sistema nervoso. Esta seleção foi feita com base nas informações presentes nos bancos de dados (www.uniprot.org).

O gene *Lrrk2* aparenta estar relacionado com doenças neurodegenerativas (Tabela 3). É responsável pela fosforilação das proteínas α -sinucleína e tau. Sua atividade pode desencadear a acumulação dessas proteínas, levando à degeneração dos neurônios. Este gene parece estar relacionado ao Mal de Parkinson, doença neurodegenerativa caracterizada por uma perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra. (Zimprich et al, 2004).

Os transportadores da família *Slc38* (Tabela 3) participam de várias vias fisiológicas, incluindo a transferência de glutamina dos astrócitos para os neurônios no SNC (Mackenzie et al, 2004). O glutamato funciona como transmissor sináptico, que causa excitação neuronal, e é secretado por terminações pré-sinápticas em várias vias sensoriais e em algumas áreas do córtex (Guyton et al, 1998).

Existem oito genes da família KIF com expressão no cérebro dos camundongos, incluindo *Kif21A* (Tabela 3), detectado em cérebros de camundongos adultos (Miki et al, 2001). A kinesina, proteína produzida por este gene, é encontrada em todo o neurônio, e auxilia no transporte sináptico ao longo dos microtúbulos (Marszalek et al, 1999).

O gene *Cacnb3* (Tabela 3) codifica canais de cálcio voltagem-dependentes e contribui para o funcionamento dos mesmos, aumentando o pico da corrente iônica e alterando as voltagens necessárias para ativação e inativação destes canais (Universal Protein Resource).

O gene *Rnd1* (Tabela 3) faz parte de uma família de Rho GTPase, que é reguladora de alterações morfológicas nos neurônios, reorganizando o citoesqueleto de actina. *Rnd1* é expresso principalmente no córtex cerebral e hipocampo durante a etapa de formação de sinapse, e induz a formação de processos neuronais (Ishikawa et al, 2003).

O cerebelo e os núcleos da base possuem, dentre outras funções, o controle dos movimentos involuntários do organismo. Uma disfunção destes tecidos pode comprometer estes movimentos. No entanto, disfunções cerebelares são sempre acompanhadas por

alterações no equilíbrio e por tremores corporais, estes últimos também denominados ataxia de marcha, pois afetam os membros, prejudicando a locomoção. Se estes sintomas não são observados, o comprometimento cerebelar é improvável. Nos animais *Sacudidor de Cabeça* não foram observadas alterações de locomoção. Além disso, a análise histológica do cerebelo corrobora esta afirmação, já que não foi encontrado nenhum padrão anormal nas células dos animais mutantes. Os animais afetados foram considerados aptos em todos os testes comportamentais, não apresentando sinais de desequilíbrio, e os tremores estão restritos à região da cabeça e pescoço.

Foram observadas deformações morfológicas em um pequeno número de estereocílios. Alguns encontravam-se até mesmo ausentes em determinadas regiões da cóclea. No entanto, verificou-se, através dos testes comportamentais, que essa característica não afetou a capacidade auditiva dos mutantes, nem mesmo seu equilíbrio. Os animais reagiram ao ouvir o barulho feito pela pinça. As alterações no ouvido interno, portanto, não influenciam no fenótipo do mutante e reforçam a idéia de atividade cerebelar normal.

Já foram descritos na literatura vários distúrbios neurosensoriais que levam a tremores de cabeça e pescoço. Contudo, a grande maioria deles provoca a perda da audição e alterações no equilíbrio. Pau *et al* (2004) caracterizou um mutante, *flouncer*, que apresenta distúrbios de equilíbrio e malformação do ouvido interno. O camundongo também possui movimentos anormais de cabeça e pescoço, gira em torno do próprio eixo e é hiperativo. As mutações *tilted* e *mergulhador* são alélicas e também são exemplos de mutações com alteração de equilíbrio. Há uma malformação das otocônias, o que gera um fenótipo caracterizado por incapacidade para o nado e inclinação da cabeça apenas para um lado do corpo. (Hurle *et al*, 2003). O mutante *jolting* apresenta um comportamento agitado, dificuldades de locomoção e um tremor rítmico de cabeça e pescoço, resultado de uma mutação no gene *Scn8a*, que codifica um canal iônico no cerebelo (Kohrman *et al*, 1996). O camundongo *stargazer* possui uma mutação em um gene que codifica um canal de Ca^{2+} , e cuja expressão é cérebro-específica. Os mutantes são letárgicos, desenvolvem uma ataxia de marcha e apresentam um quadro epiléptico moderado (Letts *et al*, 1998).

Os núcleos da base constituem um sistema motor acessório que funciona associado ao córtex cerebral, e é responsável pelo controle motor e de padrões complexos das atividades motoras (Guyton *et al*, 1998). Disfunções nesse sistema podem comprometer tanto os

movimentos voluntários quanto os involuntários. Podem ocorrer contrações involuntárias que aumentam com o estresse, fadiga, atividades, e desaparece durante o sono (Cecil, 2005). Os animais *Sacudidor* não apresentam tremores de cabeça e pescoço nos primeiros dias de vida. Os sintomas são observados a partir do oitavo dia, sugerindo uma possível degeneração progressiva nos núcleos da base.

Distonia é um distúrbio causado por alterações nos núcleos da base. É caracterizada por contrações musculares involuntárias, e podem ser classificadas em: sustentadas (tônicas) ou espasmódicas (rápidas ou clônicas), padronizadas e repetitivas, causando movimentos de torção (ex: torcicolo, virada involuntária da cabeça), flexão ou extensão (ex: extensão involuntária do pescoço) e de aperto ou posturas anormais. A distonia é usualmente contínua, porém ocorre em alguns casos apenas durante períodos de atividades. À medida que progride, as contrações involuntárias também aparecem em repouso, é exacerbada pelo estresse, fadiga, por atividade ou por uma alteração na postura, desaparecendo durante o sono (Cecil, 2005).

O tremor essencial também é causado por alterações nos núcleos da base, e é o tipo de tremor mais comumente encontrado nos países desenvolvidos. É herdado com um padrão autossômico dominante de alta penetrância. Possui muitas variantes, incluindo o tremor isolado da cabeça, voz, língua, facial e do queixo (Cecil, 2005).

Através de uma maior resolução no mapeamento genético, com a seleção de novos marcadores polimórficos na região delimitada, será possível escolher apenas um gene candidato, e análises de sequenciamento e expressão gênica irão confirmá-lo como responsável pela mutação *Sacudidor de Cabeça*.

Os núcleos da base possuem um papel fundamental na manutenção dos movimentos involuntários e coordenados do organismo. Uma degeneração destes núcleos pode provocar, além de outros acometimentos, tremores generalizados ou específicos de alguma região. O diagnóstico muitas vezes é confundido com distúrbios psiquiátricos, devido à gama de sintomas que uma disfunção nos núcleos é capaz de gerar (Cecil, 2005). O mutante *Sacudidor de Cabeça* é o novo membro da coleção de mutantes neurológicos, e seu estudo mais aprofundado provavelmente permitirá novas descobertas genéticas e funcionais dos núcleos da base, permitindo entender melhor o desenvolvimento do sistema nervoso.

Agradecimentos

À Dr^a. Celine Pompéia, da Universidade de São Paulo, por ajudar na coleta das amostras de ouvido interno; ao Dr. Luiz Roberto, neurologista, professor da PUC/MG, por auxiliar no diagnóstico fenotípico do mutante.

Referências Bibliográficas

CECIL. *Tratado de medicina interna*. 22^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda, 2005.

GUYTON, A.C.; Hall, J.E. *Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

HURLE, B.; IGNATOVA, E.; MASSIRONI, S.M; MASHIMO, T.M.; RIOS, X.; THALMANN, I.; THALMANN, R.; ORNITZ, D.M. Non-syndromic vestibular disorder with otoconial agenesis in *tilted/mergulhador* mice caused by mutations in otopetrin 1. *Human Molecular Genetics* 2003; 12(7).

ISHIKAWA, Y; KATOH, H; NEGISHI, M. A Role of Rnd1 GTPase in Dendritic Spine Formation in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23(25):11065-11072.

KOHRMAN, D.C.; SMITH, M.R.; GOLDIN, J.H.; MEISLER, M.H. A Missense Mutation in the Sodium Channel Scn8a Is Responsible for Cerebellar Ataxia in the Mouse Mutant *jolting*. *The Journal of Neuroscience* 1996; 16(19).

LETTS, V.A.; FELIX, R; BIDDLECOME, G.H.; ARIKKATH, J.; MAHAFFEY, C.L.; VALENZUELA, A.; BARTLETT, F.S.; MORI, Y; CAMPBELL, K.P.; FRANKEL, W.N. The mouse stargazer gene encodes as neuronal Ca²⁺-channel γ subunit. *Nature Genetics*, 1998; 19.

MACKENZIE, B.; ERICKSON, J.D. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Archives – European Journal of Physiology* 2004; 447: 784-795.

MARSZALEK, J.R.; WEINER, J.A.; FARLOW, S.J.; CHUN, J.; GOLDSTEIN, L.S.B. Novel Dendritic Kinesin sorting Identified by Different Process Targeting of Two Related Kinesins: KIF21A and KIF21B. *The Journal of Cell Biology* 1999; 145(3).

MASSIRONI, S.M.G.; SCHAMBER-REIS, B.L.F.; CARNEIRO, J.G; BARBOSA, L.B.S.; ARIZA, C.B.; SANTOS, G.C.; GUENÉT, J.L.; GODARD, A.L.B. Assessing gene function by inducing mutations in the mouse genome. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006 (In Press).

MIKI, H.; SETOU, M.; KANESHIRO, K.; HIROKAWA, N. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(13).

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLENSKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 1998; 13(3): 1915.

PAU, H.; HAWKER, K.; FUCHS, E.; De ANGELIS, M.A.; STEEL, K.P. Characterization of a New Mouse Mutant, Flouncer, with a Balance Defect an Inner Ear Malformation. *Otology & Neurotology* 2004; 25:707-713.

ZIMPRICH, A.; BISKUP, A.; LETTNER, P.; LICHTNER, P.; FARRER, M.; LINCOLN, S.; KACHERGUS, J.; HULLHAN, M.; ULTTI, R.J.; CAINE, D.B.; STOESSI, A.J.; PFEIFFER, R.F.; PATENJE, N.; CARBAJAL, I.C.; VLEREGGE, P.; ASMUS, F.; MÜLLER-MYHSOK, B.; DICKSON, D.W.; MELTINGER, T.; STROM, T.M.; WSZOLEK, Z.K.; GASSER, T. Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleiomorphic Pathology. *Neuron*, 2004; 44: 601-607.

UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE. Available in <<http://www.uniprot.org>>

ENSEMBL GENOME BROWSE Available in <<http://www.ensembl.org>>

MOUSE GENOME INFORMATICS Available in <<http://informatics.jax.org>>

Conclusão

A geração de novas mutações tem se consolidado a cada dia que passa como uma estratégia eficiente para o estudo de função gênica, pois acelera as pesquisas produzindo um número maior de mutantes em um curto período de tempo. O ENU é o agente químico mais eficiente em camundongos, já que sua taxa de mutação é extremamente alta. Além disso, este agente age nas células espermatozoniais, permitindo a geração de um grande número de mutações a partir de um camundongo.

Mesmo com todas as vantagens, é necessária uma série de precauções quanto ao uso do ENU nos animais. É importante escolher uma linhagem que seja resistente ao mutágeno e que reproduza bem a mutação introduzida. A análise fenotípica deve ser rigorosa, com especial atenção às mutações neurológicas, que são de difícil identificação. Para isso existem testes diagnósticos que devem ser corretamente aplicados, de forma a caracterizar bem o fenótipo. O manuseio dos animais também merece atenção, pois, se submetidos a situações de estresse os camundongos podem apresentar comportamentos que gerariam confusão e produziriam resultados falso-positivos nos testes.

O mapeamento genético é um método eficaz e confiável para localizar um determinado *locus*. É também o primeiro passo para a identificação de um gene conhecido unicamente pelo seu fenótipo alterado. As análises de segregação entre os marcadores permitem estabelecer de maneira precisa a região em que se encontra a mutação. Os marcadores utilizados no mapeamento devem ser escolhidos com atenção. É importante que eles cubram todo o genoma do camundongo e, de preferência, possuam um polimorfismo grande entre as duas linhagens testadas, para facilitar a análise dos resultados. A seleção dos genes candidatos deve ser feita de maneira criteriosa, estudando-se a função e as regiões de maior expressão de cada um.

Por fim, a utilização de um protocolo adequado para a administração do ENU, o manuseio correto dos animais, uma boa caracterização da mutação, seu mapeamento genético e uma análise rigorosa dos genes candidatos são etapas fundamentais no estudo de função gênica.

Referências Bibliográficas

BALLING, R. ENU Mutagenesis: Analyzing Gene Function in Mice. *Annual Reviews of Genomics in Human Molecular Genetics*, 2001; 2: 463-492.

BEIER, D.R; HERRON, B.J. Genetic mapping and ENU mutagenesis. *Genetica*, 2004; 122: 65-69.

BENAVIDES, F.F.; GUÉNET, J.L. *Manual de genética de roedores de laboratório – Princípios básicos y aplicaciones*. Madrid: Universidad de Alcalá, 2004. 312p.

BECKERS, J; de ANGELIS, M.H. Large-scale mutational analysis for the annotation of the mouse genome. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001; 6: 17-23.

BIRCHMEIER, C; TREIER, M. Genomic boosts mouse molecular genetics. *TRENDS in Genetics*, 2001; 17(12): 691-692.

BOYD, Y. Genetic Mapping of the mouse genome. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology*, 1998; 14: 120-134.

CHAMBERS, G.K; MacAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2000; 126: 455-476.

FLAHERTY, L. Generation, Identification and Recovery of Mouse mutations. *METHODS: A Companion to methods in Enzymology*, 1998; 14: 107-118.

GUÉNET, J.L. Chemical mutagenesis of the mouse genome: an overview. *Genetics*, 2004; 122: 9-24.

MASSIRONI, S.M.G.; SCHAMBER-REIS, B.L.F.; CARNEIRO, J.G; BARBOSA, L.B.S.; ARIZA, C.B.; SANTOS, G.C.; GUENÉT, J.L.; GODARD, A.L.B. Assessing gene function by

inducing mutations in the mouse genome. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2006 (submetido).

MONTAGUTELLI, X. Effect of the Genetic Background on the Phenotype of Mouse Mutations. *Journal of American Society of Nephrology*, 2000; 11:S101-S105.

MOORE, K.J. Utilization of mouse models in the discovery of human disease genes. *Drug Discovery Today*, 1999; 4(3): 123-128.

PAIGEN, K. One Hundred Years of Mouse Genetics: An Intellectual History. I. The Classical Period (1902 – 1980). *Genetics*, 2003; 163:1-7.

PANTHIER, J.J.; MONTAGUTELLI, X; GUÉNET, J.L. *Les organismes modèles – Génétique de la souris*. Paris: Éditions Belin, 2003. 283p.

PROSSER, H; RASTAN, S. Manipulation of the mouse genome: a multiple impact for drug discovery and development. *TRENDS in Biotechnology*, 2003; 1-9.

REW, D.A. Of digital mice and man. *European Journal of Surgical Oncology*, 2003; 29: 624-627.

WATERSTON, R.H.; LINDBLAD-TOH, K; BIRNEY, E. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 2002; 420: 520-562.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)